様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年　5 月　1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19570096
研究課題名（和文）DNA 塩基配列および化学成分を考慮したコショウ科サダソウ属の同定システムの構築
研究課題名（英文）Construction of an identification system in considering molecular phylogeny and phytochemistry

研究代表者
邑田　裕子（MURATA HIROKO）
摂南大学・薬学部・助手
研究者番号：20167620

研究成果の概要（和文）：
コショウ科サダソウ属の利用開発に資するため、現地および栽培品からサダソウ属の多様性をカバーするようなサンプリングを行ない、迅速な同定の手がかりとして、形態形質、化学成分の比較と DNA 塩基配列に基づく系統樹の作成を行なった。形質の観察と記録は生植物を栽培して行ない、データベースにまとめつつあるが、開花に至らないものも多く、進行中である。化学成分のスクリーニングの結果、セコリグナン等、多様性を示す同定に有望な成分がいくつか特定できた。分子系統解析は予想外の技術的困難があったが、既知の 29 種類の配列を加えた 69 配列について系統樹を作成することができた。

研究成果の概要（英文）：
For the bases of development of plant resources in the genus *Peperomia* (Piperaceae), an easy-to-use identification system was tried to construct. Morphological database was prepared but still not completed due to unsatisfied condition of the material cultivated. Several chemicals including secolignan that are potential tool for the identification of taxa were recognized. And a molecular phylogenetic tree with 69 OTUs including 29 known sequences was constructed. Integration of the obtained information is on the way.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1700000	510000	2210000
2008 年度	900000	270000	1170000
2009 年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
総　計	3400000	1020000	4420000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類
キーワード：Piperaceae、*Peperomia*、コショウ科、サダソウ属、化学成分、分子系統、分子同定

1．研究開始当初の背景

コショウ科 Piperaceae は 8～12 属、1400

～3000 種類と言われる比較的大きな科であり、多くはコショウ属とサダソウ属でしめられている。このうちコショウ属は有用植物として活用されているものもあるが、サダソウ属はほとんど利用されていない。しかし、サダソウ属については今まで化学成分の研究はあまり行われていないものの、ある種類からはリグナン類、プレニルフェノール類が単離され、これらには強い抗腫瘍活性、抗寄生虫（シャーガス病）活性があることが明らかにされており、潜在的な利用価値の高いグループと考えられる。そこで我々は現在、サダソウ属の薬用利用の促進を目指して化学成分研究を進め、生物活性スクリーニングを開始しているが、種の同定が困難であり、また種間の系統関係がわかっていないことが研究の進行を妨げている。サダソウ属 *Peperomia* は約 1600 種類存在するが、現在まで近代的な意味での系統分類学的研究はなされていない。一方、化学的な成分研究が行われている種類も数種類にすぎない。また花器官が退化的で目立った特徴がなく、種間の形態差の小さい種類も多いので分類は一般に困難である。

２．研究の目的

そこで我々はそれまで行ってきたウマノスズクサ属やコショウ属についての系統分類学的、化学分類学的研究を踏まえ、自らの研究によりサダソウ属の同定を効率よく行うための同定システムを構築することを目的として本研究を行うこととした。具体的には、入手可能な資料のすべてについて外部形態や染色体についての特徴を明らかにするとともに、サダソウ属の系統解析・分子同定に有効である DNA 領域の塩基配列を明らかにして信頼度の高い系統樹を作成し。また、特徴的な化学成分的を分析して、これらを分類のツールとして総合的に用いた同定システムを構築することを目的とした。

３．研究の方法

１）資料の収集：サダソウ属は園芸の目的で多くの種類が輸入されているので、それらを国内の植物園から分譲してもらい、国外の植物園にも分譲を依頼する。また商業的に購入して収集する。台湾、マレーシア、インドネシアなど東南アジア地域を中心にサダソウ属の調査を行う。これらを通じて、標本、生植物、DNA 抽出用サンプルを採集し、生態、生育状況により、成分分析用の資料も採集する。特に形態観察用の液浸標本を作製して持ち帰る。収集した生植物は摂南大学薬用植物園および東京大学大学院理学系研究科附属植物園に植えて、挿し穂などで個体を増殖し、DNA 抽出用、化学成分分析用に用いる

２）形態観察：上記で得られたサンプルについて、できるだけ栽培する生個体を用いて花序とその他の形態形質を観察し、特徴を把握する。

３）化学分析：化学分析は摂南大学薬学部および岐阜薬科大学において邑田裕子・稲富と田中が行う。各植物サンプルは乾燥後、粉砕しアセトンで室温下抽出する。得られた抽出液は減圧下溶媒を除去しアセトンエキスとする。アセトンエキスはシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 TLC を繰り返すことにより目的の化合物を得る。得られた化合物については、各種二次元法を用いた NMR および MS スペクトルの解析からそれぞれの構造を決定する。採集した資料から抽出・分析を行い、HPLC を用いて定量し、比較検討する。

４）DNA 塩基配列解析：DNA 塩基配列解析は分担者邑田仁が東京大学附属植物園において大学院生とともに行う。

全 DNA 抽出：シリカゲルで乾燥させた葉（5mm×3cm）を、多検体細胞破砕機・マルチビーズショッカーを用いて粉末状に粉砕し、Setoguchi and Ohba（1995）の HEPES（2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid）法により、葉粉末を洗浄し、不純物を除去した後、CTAB（cetyltrimethylammonium bromide）法を一部改良した方法により、洗浄した葉粉末から全 DNA を抽出する。

目的領域の PCR 増幅：葉緑体 DNA *trnL - trnL - trnF* 領域と核 rDNA ITS 領域の塩基配列を PCR-ダイレクトシークエンス法により決定する。目的領域に合わせて設計されたプライマーにより PCR 増幅し、増幅産物をアガロースゲルで電気泳動し、目的断片の増幅の確認と切り出しを行い、GeneClean III Kit（BIO101 社, USA）を用い、取扱説明書に従い DNA 断片を精製する。

サイクルシーケンス反応：精製した DNA 断片を鋳型として、ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems 社, USA) を用いて、取扱説明書に従いサイクルシーケンス反応を行う。

塩基配列の決定、アライメントと系統解析：電気泳動後に得られた波形データをアセンブルソフトウェア AutoAssembler (Applied Biosystems 社, USA)を用いてアセンブルし、塩基配列を決定する。得られた塩基配列は、アライメントソフトウェア Clustal X (Thompson,J.D. et al. 1997)を用いてマルチプルアライメントを行う。系統解析は、系統解析プログラム PAUP ver.4.0 beta10 for Mac (Swofford 2002)を用い、最節約法に基づく系統解析を行う。これに基づき、未同定の資

料の同定に役立つ系統樹を作成する。ブーツストラップ解析は発見探索法を用い、1,000回の繰り返しにより行う。

４．研究成果

１）現地調査と資料の収集

京都府立植物園を始め各地の植物園に依頼し、植物資料の分譲を受けた。また *Peperomia* 属植物を多く保有している栽培業者や個人から入手した。

さらに、次に述べる化学成分分析の結果、栽培増殖した小笠原産シマゴショウと摂南大学で従来から栽培している奄美大島産サダソウの間にはほとんど化学成分的な差を見いだすことが無かったので、化学成分と共に DNA 塩基配列の変異についても詳細に比較するべく国内各地におけるサダソウの収集を行った。

2007 年 11 月 16 日から 12 月 6 日までインドのムンバイ、コールハポールの Shivaji University、コルカタの Botanical Surveu of India にて標本調査、情報収集、資料収集、コールハポールの南西の西ガーツ山脈周辺での現地調査を行った。Shivaji University で栽培する *Peperomia* の生植物を資料として分譲してもらった。2008 年 11 月 16 日から 11 月 23 日まで中国浙江省杭州市の浙江大学生命科学学院にて、情報収集、標本調査、杭州市並びに温州市周辺地域にて現地調査を行った。2009 年 2 月 6 日から 9 日まで鹿児島県熊毛郡種子島にて現地調査、植物採集を行った。種子島立山海岸にてサダソウを採集。独立行政法人医薬基盤研究センター種子島研究部にて *Peperomia* 属植物の分譲を受けた。

2009 年 8 月 20 日から 25 日まで沖縄県石垣島及び宮古島にて、現地調査、植物採集を行った。石垣市山原にてサダソウを採集した。2010 年 1 月 27 日から 29 日まで沖縄県沖縄本島にて現地調査、植物採集を行った。北部ネクマチジにてサダソウを採集した。

形態形質

得られた資料について、現地および栽培下で特に花形態の形態観察を行ない、高解像度の写真等で記録してきた。他の形質とともにデータベースにまとめつつあるが、栽培が困難で開花に至らないものもあり、まだ完成できていない。

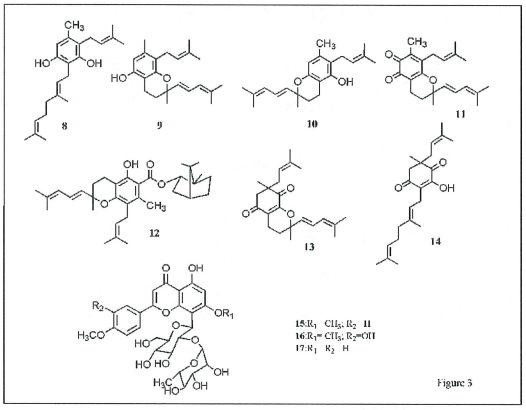
数種の *Peperomia* 属植物の化学成分

(1) シマゴショウ (*Peperomia boninsimensis*) 地上部の成分

シマゴショウは小笠原固有の植物であり、絶滅危惧種 II 類に指定されている。この植物を東京大学小石川植物園および摂南大学薬草園で栽培したものを研究材料とした。その結果、Figure 1 に示した化合物 1-3 を単離し、その構造を決定した。この３種の化合物はすでにサダソウ(*Peperomia japonica*)から単離されている化合物である。シマゴショウとサダソウの抽出エキスを調製し、薄層クロマトグラフィーで比較した場合、この２種は区別できないほど成分系が似通っていた。

(2) *Peperomia glabella* 地上部の成分

Peperomia glabella は熱帯アメリカ原産で観葉植物として日本でも知られている。市販の本植物の成分検索を行ったところ、Figure 1 の 4-7 に示す化合物を単離し、その構造を決定した。



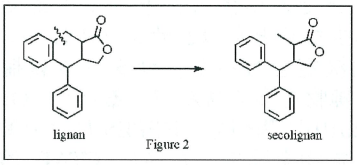


Figure 1 に示した化合物(1-7)は一般的にセコリグナン(secoligna)と呼ばれる。セコリグナンというのは、figure 2 に示したように、ある系統のリグナンの炭素―炭素結合が切断(seco)されて生成すると考えられる。コショウ科でもコショウ属(Piper)では、リグナンタイプの化合物は多く見出されるが、セコリグナンの存在は知られていない。Figure 1 に示したようなセコリグナンは、*Peperomia* のある種の化学系統を代表する化合物と思われる。また、他の研究者の報告では、Piper に含まれるリグナンに類似した化合物を含む *Peperomia* も存在する。

(3) *Peperoima obtusifolia* 地上部の成分

Peperomia obtusifolia は熱帯アメリカ原産の肉厚の葉を持つ種で、日本では観葉植物として広く知られている。この植物の成分については、初期の段階では市販品を、後に摂南大学で栽培したものを用いた。成分検索の結果、低極性部より、figure 3 に示したように化合物 8-14 を高極性部より 15-17

を単離し、その構造を決定した。化合物 8-14 は高度にプレニル化したベンゼン誘導体であり、シャーガス病に効果があるとされている *Peperomia galioides* の成分系に類似していた。この系統の化合物はある種の Piper にも含まれているものの、*Peperomia* ではプレニル化、酸化などによって複雑化しているように思われ、上記セコリグナンとともに *Peperomia* の化学分類上有用な成分である。
また、化合物 15-17 はフラボンの C-配糖体である。フラボン C-配糖体そのものは天然に広く分布しており、*Peperomia* の特異成分とは言えないが、ある種の *Piper* にもこの系統の化合物が含まれることが知られており、アグリコン部の骨格や結合する糖の種類によって、化学分類のマーカーになりうる。

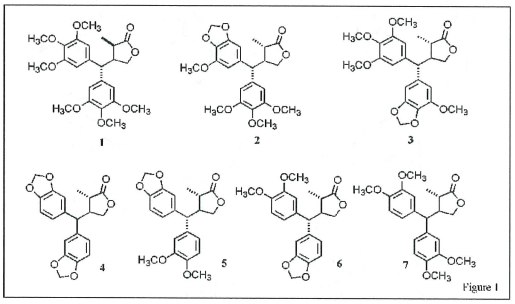


Figure 1

分子系統解析

本研究で入手することのできたサンプルのうち少なくとも 42 サンプルについて、塩基配列決定を行った。サダソウ属植物は、葉に不純物を多く含んでいるため、Ohi-Toma et al.(2010)に基づき、HEPES により葉に含まれる不純物を除去した後に CTAB 溶液で抽出し、さらにフェノール・クロロフォルム溶液を用いて不純物を取り除く手順を利用した。全抽出サンプルのうち代表数サンプルを用いて、最近のサダソウ属の分子系統解析の研究（Wanke et al. 2006 や Samain et al. 2009）を参考にして、核 DNA の ITS 領域、および葉緑体 DNA *trnK* intron と *matK* 遺伝子領域について PCR 増幅とダイレクトシークエンスによる塩基配列の決定を行ったところ、多コピー遺伝子領域である ITS 領域についてはクローニング法などを用いての塩基配列決定が必要であるため、簡便な方法が適さないことが明らかになった。そこで残りのサンプルについては *trnK* intron と *matK* 遺伝子領域の解析を行った。*trnK* intron と *matK* 遺伝子領域は、全長が約 2500bp ほどあるため、Johnson and Soltis (1994)、Ooi et al. (1995)、Wanke et al. (2006)のプライマーを組み合わせて利用し、３分割して PCR 増幅をした。ただし、大部分のサンプルで *trnK* intron 3'側部分（*matK* 遺伝子の 3'側の一部も含む）の PCR 増幅効率が非常に悪かったため、*matK* 遺伝子と *trnK* intron の 5'側の約 1500bp を解析に用いることにした。また 2 サンプルについては、*trnK* intron の 5'側のみしか塩基配列を決定できなかったため、系統解析には 40 サンプルを用いた。系統解析には、Genbank に登録される Wanke et al. (2006)および Samain et al.(2009)を用いたが、登録される配列には、葉緑体 DNA であるにも関わらず、配列に混合塩基が含まれていたり、配列決定ができていない部分が 100bp 以上含まれており、半数近くの登録配列を用いることができなかった。結果として、既知の 29 種類の配列を加えた 69 配列を用い、Samain et al.(2009)に従いサダソウ属の１群を外群として系統解析を行った。

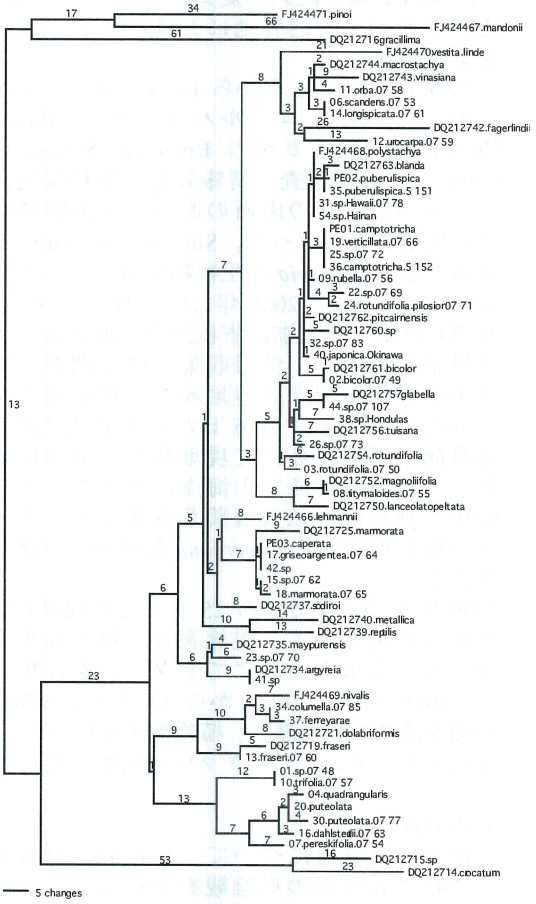


Fig.4　葉緑体 DNA 塩基配列変異に基づく系統樹。サンプル名の頭に番号がついているものは本研究で新規に解析したもの。

その結果 Fig.4 に示す系統樹が得られた。このように、様々なレベルで比較的はっきりしたクレードが示されており、塩基配列を決定することにより未知な資料を同定する手がかりとして用いられることが示された。

５．主な発表論文等

該当無し。

６．研究組織

(1)研究代表者
邑田　裕子（MURATA HIROKO）
摂南大学・薬学部・助手
研究者番号：20167620
(2)研究分担者
稲富　由香（INATOMI YUKA）
摂南大学・薬学部・助手
研究者番号：00258089
邑田　仁（MURATA JIN）
東京大学・理学系研究科・教授
研究者番号：90134452
田中　稔幸（TANAKA NORIYUKI）
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：60137065